

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501686

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)2月23日

(51) Int.Cl.⁶

C12N 15/09

A01H 1/00

C12N 9/02

識別記号

ZNA

ZNA A 8502-2B

9359-4B

9050-4B

庁内整理番号

FI

C12N 15/00

ZNA A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全17頁)

(21) 出願番号 特願平5-502480
(86) (22) 出願日 平成4年(1992)7月16日
(85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)1月17日
(86) 国際出願番号 PCT/AU92/00356
(87) 国際公開番号 WO93/02195
(87) 国際公開日 平成5年(1993)2月4日
(31) 優先権主張番号 PK7248
(32) 優先日 1991年7月17日
(33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 コモンウェルス・サイエンティフィック・
アンド・インダストリアル・リサーチ・オ
ーガナイゼーション
オーストラリア連邦オーストラリアン・キ
ャピタル・テリトリ 2601, キャンベ
ル, ライムストーン・アベニュー (番地な
し)
(72) 発明者 ロビンソン, シモン・ピアース
オーストラリア連邦サウス・オーストラリ
ア州5061, ハイド・パーク, オベイ・アベ
ニュー 74
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

(57) 【要約】

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有する
ポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列また
はそのフラグメント。

請求の範囲

1. ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント。
2. トランシッドペプチドをコードするPPO遺伝子のブレ配列を含むDNA配列。
3. 正常なPPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項1に記載のDNA配列。
4. 触媒開裂部位を組込んでいる請求項3に記載のDNA配列。
5. ブレ配列が、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えられている請求項2に記載のDNA配列。
6. 図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシッドペプチド配列および成熟グレープバインPPOポリペプチドをコードする配列を含む請求項2に記載のDNA配列。
7. 図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
8. 図3に図示したような、リンゴ果実のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
9. 図4に図示したような、ジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
10. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント；およびプラスミド発現ベクターを提供し；そして該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法。
11. DNA配列を、植物試料から単離されたポリアデニル化RNAから生成する請求項10に記載の方法。

18. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデノシン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し；そしてそのように生成されたポリアデニル化cDNAを、PCRを用いて増幅させることを含む請求項13に記載の方法。
19. PPO特異的プライマーが、ブドウPPOに関して配列
5'-AATCTTGTGGTACTGGCG
を有するオリゴヌクレオチドプライマーでありまたは該PPO特異的プライマーが、ジャガイモ塊茎PPOに関して配列
5' GACGGTACATTAGTCTTAAAT
を有するオリゴヌクレオチドプライマーである請求項18に記載の方法。
20. cDNAを増幅させる工程が、配列
5'-GACTCGAGTCGACATCGAATTTTTTTTTTTTTT
を有するオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列
5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG
またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列
5'-TGCTCATCAACTGGAGTTGAG
を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる請求項19に記載の方法。
21. プラスミド発現ベクターがプラスミドベクタープラスクリプトSK⁺であり、DNA配列がcDNA配列であり、DNA配列をプラスミド発現ベクター中に配置する工程が、該cDNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付きにし；そのように生成されたcDNAをアガロースゲル上で分別し；予想の寸法のフラグメントをゲルから単離し；そして該フラグメントをプラスクリプトSK⁺ベクターのHindIIIまたはE

12. 植物試料を、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択する請求項11に記載の方法。
13. PPOポリペプチド源を提供し；PPOをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し；そしてコピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含む請求項11に記載の方法。
14. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そしてそのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅させることを含む請求項13に記載の方法。
15. アダプタープライマーが、配列
5'-GACTCGAGTCGACATCGAATTTTTTTTTTTTTT
を有するオリゴヌクレオチドアダプターである請求項14に記載の方法。
16. cDNAを増幅させる工程が、配列
5'-GACTCGAGTCGACATCG
を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いる請求項15に記載の方法。
17. 5'末端プライマーが、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合に配列
5'-CCATTCAGGCCTCCGATATTTTCAAGTGTGG；
豆cDNAの増幅用に用いられる場合に配列
5'-GCGGATCCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA；
リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合に配列
(5'-GCGAATTCGA[AG]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA)；
そしてジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合に配列
GEN3: (5'-GCGAATTCCTT[TC]TTCCTT[TC]CA[TC][AC]G)
GEN7: (5'-GCGAATTCAA[TC]GTGA[TC][AC]GATGTGG)
を有する請求項16に記載の方法。

- cori部位に連結することを含む請求項10に記載の方法。
22. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミド。
23. DNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含む請求項22に記載の組換えプラスミド。
24. DNA配列が、ブドウ、豆、リンゴまたはジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする請求項23に記載の組換えプラスミド。
25. 植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、修飾PPO遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および植物試料を提供し；そして該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。
26. DNA構築物が、正常PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項25に記載の方法。
27. DNA構築物が、PPO遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいる請求項26に記載の方法。
28. 植物試料を、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆から選択された植物から得る請求項25に記載の方法。
29. DNA構築物が、DNA配列を導入された二成分ベクター；および果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項25に記載の方法。
30. 植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および植物試料を提供し；そして該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。

31. DNA構築物が、トランシットペプチドをコードするPPOブレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含む請求項30に記載の方法。

32. PPOブレ配列が、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてるように他の標的配列と置き換えられている請求項31に記載の方法。

33. 植物試料を、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから選択された植物から得る請求項30に記載の方法。

34. DNA構築物が、DNA配列を導入された二成分ベクター；および果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項30に記載の方法。

35. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブ。

36. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、cDNAまたはゲノムライブラリー；およびPPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして該プローブを該ゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法。

37. DNAプローブが、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含む請求項36に記載の方法。

38. DNAプローブを、植物種からの全cDNA；およびPPO遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そしてPCRを実施して、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを

増幅させることを含む方法によって製造する請求項37に記載の方法。

39. オリゴヌクレオチドプライマーが、PPOタンパク質上の銅結合性部位に対応するDNA配列を含む請求項38に記載の方法。

40. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、植物から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

該mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法。

41. PPO遺伝子またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

発現ライブラリー；および

精製PPOタンパク質に対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして

該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法。

42. N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する、実質的に純粋な状態のPPOタンパク質。

明 細 書

ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

本発明は、果実および野菜のポリフェノールオキシダーゼ(PPO)活性を変更する方法並びにそこで使用するためのDNA配列に関する。

植物組織の褐変は、しばしば、引続きの損傷または損害を引き起こし、概して、これは果実および野菜を腐敗させる結果となる。望ましくない褐変は、植物材料を加工して食品または他の製品を製造する際にも生じる。これらの褐変反応を防止する処置は輸送、貯蔵および加工中に講じられる。しばしば、これは二酸化硫黄などの化学物質の使用を必要とするが、これらの物質の使用は、それらの安全性および消費者の許容の懸念ゆえに将来において制限されると考えられる。例えば、米国食品医薬品局は、1986年に、大部分の生鮮果実および野菜に対する亜硫酸塩の使用を禁止した。褐変に対する感受性が本質的に低い果実および野菜変種の生産は、これらの化学物質処理の必要をなくするであろう。

したがって、本発明の目的は、先行技術に関連した1種類またはそれ以上の問題を克服するまたは少なくとも軽減することである。

植物の褐変が主として酵素PPOによって触媒されていることは理解される。PPOは植物細胞の色素体中に局在しているが、酵素のフェノール性基質は植物細胞液胞中に貯蔵されている。この分画は、植物細胞が損傷され、そして酵素およびその基質が混合されない限り、褐変反応を生じさせない。この酵素の量を減少させることができるならば、褐変に対する組織の感受性は減少するであろう。

PPO配列情報を用いて、正常なPPO遺伝子の発現を減少させるように植物を形質転換することができる合成遺伝子を構築し、それによって酵素の合成を減少させることができる。

更に、ある場合において、例えば、紅茶、ココア、コーヒー、黒胡椒、ブラックオリーブ等の生産においては、植物の褐変反応が望ましいことが理解される。これらの場合、PPOの量を増大させて、望ましい程度の褐変または風味成分の変化を生じさせることが望ましいことがある。

正常な植物の成長および発育におけるPPOの役割は、現在のところ理解されていない。この酵素の増大した濃度が植物病原体に対する増大した耐性と相関している場合が多数存在している。当然の結果として、PPO活性の水準を増大させる植物の遺伝子操作は、病原体および有害生物に対する有用な耐性を与えることができる。

グレープバイン(grapevine)のPPO遺伝子は、成熟タンパク質のN末端の上流の追加の103アミノ酸をコードする。この領域は、葉緑体トランシットペプチドの性質を有し、しかもタンパク質が葉緑体中に引き入れられ且つ成熟PPOタンパク質を生産するように処理されるように目的をなすものであると考えられる。この遺伝子による植物の形質転換は、したがって、他種においてグレープバインPPOの正しい標的および成熟を生じ且つこれらの組織の色素体中で活性グレープバインPPO酵素の蓄積を引き起こすことができる。

本明細書中で用いられる「PPOをコードしている遺伝子」、「PPOをコードする遺伝子」または「PPO遺伝子」は、PPO遺伝子またはそれと実質的に相同の配列を意味すると理解されるべきである。

本発明の第一の態様において、ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

DND配列は、トランシットペプチドをコードするPPO遺伝子のブレ配列を含んでいてよい。

DND配列は修飾されていてもよい。DNA配列は、正常なPPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含んでいてよい。

DNA配列は、触媒開裂部位を更に含んでいてよい。

或いは、ブレ配列は、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えることができる。

DNA配列は、図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質を含んでいてよい。

DNA配列は、図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポ

ポリペプチドをコードする遺伝子を含んでよい。

DNA配列は、図3に図示したような、リンゴ果実PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでよい。

DNA配列は、図4に図示したような、ジャガイモ塊茎PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでよい。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント；および

プラスミド発現ベクターを提供し；そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法を提供する。

PPOをコードするDNA配列は、例えば、植物試料から単離されたポリアデニル化RNAから生成することができる。植物は、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択することができる。好ましくは、植物試料は、スルタナブドウ果実、ソラマメの葉、リンゴの外皮若しくは皮層またはジャガイモ塊茎から単離される。

PPOをコードするDNA配列を提供するために、本発明の好ましい態様において、組換えDNAプラスミドの製造方法は、

PPOポリペプチド源を提供し；

PPOをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し；そして
コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含むことができる。

ポリアデニル化RNAの単離は、オリゴ-dTスパンカラムを用いて実施することができる。

本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアデニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅させることを含むことができる。

ポリアデニル化RNAと逆転写酵素との反応工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーを用いることができる。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCG

を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いることができる。

5'末端プライマーは、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

5'-CCATCAGGCGCCGATATTTTCTTCTG

を有することができる。

5'末端プライマーは、豆cDNAの増幅用に用いられる場合、配列

5'-GCGGATCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[CT]AA[CT]AA

を有することができる。

5'末端プライマーは、リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

(5'-GCGAATTCGA[AG]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA)

を有することができる。

5'末端プライマーは、ジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

GEN3:(5'-GCGAATTCCT[TC][TC]TTCCTT[TC]CA[TC][AC]G)

GEN7:(5'-GCGAATTCAA[TC]GTGA[TC][AC]GATCTGG)

を有することができる。

或いは、本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアデニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデノシン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し；そして

そのように生成されたポリアデニル化cDNAをPCRによって増幅させることを含むことができる。

ポリアデニル化RNAを逆転写酵素で処理する工程は、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTGCTGCTGACTGGCG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。または該PPO特異的プライマーはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-GACGGTACATTAGTCTTAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCGCGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

二本鎖cDNAのクローニングのためのプラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。プラスミドベクターブループリット

(Bluescript) SK⁺は適当であることが分かっている。

クローニング工程は任意の適当な形式をとってよい。好ましい形式は

cDNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付きに；

そのように生成されたcDNAをアガロースゲル上で分別し；

予想の寸法のフラグメントをゲルから単離し；そして

該フラグメントをブループリットSK⁺ベクターのHindIIIまたはEcoRI部位に連結することを含むことができる。

このように生成されたクローンを試験するために、適当な微生物をプラスミド発現ベクターによって形質転換することができ、該微生物を培養し、そしてそこにおいてコードされたポリペプチドを発現させることができる。微生物大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5は適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコード

するDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミドを提供する。

プラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。組換え体プラスミドは、PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列の上流の構成のプロモーター要素を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

植物PPO遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および
植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、正常PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードしている配列またはそのフラグメントを含むことができる。DNA構築物は、PPO遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいることができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆を含む群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および
植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、PPO配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むことができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから成る群より選択すること

がである。

トデンシットベプチドをコードするブレ配列は、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けて、他の標的配列と置き換えることができる。異種遺伝子を植物細胞の液胞、ミトコンドリアまたは細胞内空間に向けての配列は既に知られている。更に、グレープバインPPOに関するトランシット配列を用いて他のタンパク質を色素体に集中させることができた。

DNA構築物は、導入された遺伝子を植物中の至る所で発現させると考えられる構成的プロモーターを含むことができる。

多数の植物組織において、PPOがある組織種中で高度に発現されることは理解される。例えば、PPO活性はブドウ果実の皮において果肉の場合よりもはるかに高く、そしてジャガイモ塊茎の外皮は皮層よりも高い活性を有する。

PPO活性の水準を植物のある組織中においてのみまたは植物のある発育段階でのみ変更することは望ましいことがあるが、これは特異的プロモーター要素を用いることによって達成することができる。例えば、パタティン

(patatin) プロモーターの使用は、ジャガイモ植物の塊茎組織中においてのみPPO濃度を変更する。これは塊茎におけるPPO活性を低下させ且つ場要を減少させるが、ジャガイモ植物の他の部分におけるPPO活性は変化しない。

したがって、DNA構築物は、果実および野菜の外皮すなわち皮に対して特異的であるプロモーターを含んで、異種タンパク質を外部組織層に特異的に集中させることができる。

これは、外皮すなわち皮の性質、例えば、色、風味、病原体に対する耐性等を、消費される果実または野菜の内部とは無関係に操作することを可能にする。

好ましい態様において、DNA構築物は、PPOをコードしているDNA配列またはそのフラグメントを導入された二成分ベクターを含むことができる。

もう一つの好ましい態様において、DNA構築物の植物中への導入は、DNA構築物を有するアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) による植物の感染によることができる。

本発明のもう一つの態様において、形質転換した植物であって、正常なPPO遺伝子の発現を変更しうる合成遺伝子を含む上記植物を提供する。

PPO遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを行なって、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造することができる。

オリゴヌクレオチドプライマーは、PPOタンパク質上の銅結合性部位に対応するDNA配列を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物種から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法を提供する。

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプライマーは、リンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子配列に基づくことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOタンパク質の精製法であって、

植物試料；

デタージェント；および

1種類またはそれ以上のクロマトグラフィーカラムを提供し；

該植物試料を該デタージェントで抽出し；

そのように生成された抽出物を硫酸アンモニウムで処理し；そして

そのように生成された抽出物を、それをクロマトグラフィーカラムに通すことによって分別することを含む上記方法を提供する。

植物試料は任意の適当な種類であってよい。植物試料はグレープバイン果実であってよい。この組織は高濃度のPPOを含み、成熟ブドウ果実の果汁中の大部

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴ、タバコ、豆、モモ、ナシおよびアンズから成る群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしている配列またはそのフラグメントを含む植物用ワクチンを提供する。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供する。

プローブは、任意の適当な方式で標識することができる。放射性標識または非放射性標識を用いることができる。便宜上、プローブは、適当なプラスミドベクター中のクローン化されたインサートの形で提供することができる。

グレープバインPPO配列を用いて、この遺伝子を他の種から得るようにPCRで用いるための一般的な目的オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。植物PPOタンパク質は銅欠分子族として銅を含むことが知られており、そしてヘモシアニンおよびチロシナーゼタンパク質からの配列に対して相同を示し、これらのタンパク質上の銅結合性部位に対応するブドウタンパク質配列の二つの領域が識別された。これらの領域は種々の生物間で明らかに保存されるので、それらは、他の植物PPO遺伝子を得るためにプローブおよびプライマーを設計するのに適している。

したがって、本発明の更にもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドの遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして該プローブをゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

DNAプローブは、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含むことができる。

DNAプローブは、植物種からの全cDNA；および

分のPPO活性は固形物によるものであり、遠心分離によって果汁から分離した後にはデタージェントによって可溶化することができる。植物試料は豆の葉であってよい。

デタージェントは陽イオン性であってよい。臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) デタージェントは適当であることが分かっている。

クロマトグラフィーカラムはセファロース基材であってよい。3種類のクロマトグラフィーカラムを用いることができる。Q-セファロースに続いてフェニル-セファロース、次にヒドロキシルアパタイトが適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する実質的に純粋な状態のPPOタンパク質を提供する。

ここで、本発明を実施例および図面に関して更に充分に記載する。しかしながら、以下の説明が単に例示するためのものであることは理解されるべきであり、いかなる場合にも上記の本発明の一般性を制限するものとしてとるべきではない。

図面において、

図1：

推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質双方をコードする複合完全長GPO1 cDNAヌクレオチド配列および誘導タンパク質配列。

翻訳開始部位をボールド体で示し、成熟タンパク質のN末端に星印を付ける。破線はN末端プライマーの位置を示し、そして2本の実線は、トランシットベプチド配列をクローニングするための2種類のアンチセンスプライマーを構築するのに用いられた領域を示す。

図2：

ソラマメの葉のポリフェノールオキシダーゼのBPO1クローンの核酸および誘導タンパク質配列。実線は、ポリメラーゼ連鎖反応によってcDNAを増幅させるのに用いたB15プライマーの領域を示す。

図3：

リンゴ果実PPOをコードするクローンpSR7およびpSR8の核酸および

してTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付きにし、そして2%ヌシブ(Nusieve) GTGアガロース(FMCバイオロダクツ(Bioproductions))ゲル上で分別した。1700bpフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター(ストラタジーン・クローニング・システムズ(Stratagene Cloning Systems))のHincII部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。陽性クローン(GPOと称する)を単離し且つジデオキシ配列決定法(3)によって配列決定した。

これは、N末端プライマーの存在を確認し、そして該プライマーの下流の誘導タンパク質配列と、上記の精製ブドウPPO酵素に関して得られたN末端タンパク質配列との比較により、このクローンがブドウPPOをコードすることが確認された。

実施例4

トランシットペプチド配列のクローニング

上記の1700bpクローンでプローブされたブドウmRNAのノーザンプロットにより、該クローンとハイブリッド形成した2200bpの転写物が識別された。これは、そのクローンが成熟PPO配列のN末端をコードしていたとしても、クローンの5'プライム末端の上流に更に別の配列が存在したことを示唆した。GPO1 mRNAの5'末端を有するcDNAクローン(推定上のトランシットペプチドをコードする)を、本質的には(2)に記載の通りであるが嵌め込まれたアンチセンスプライマーを用いてブドウ果実RNAから増幅させた。第一鎖cDNAを、上記に記載の通りであるがハイブリッドdT17-アダプタープライマーの代わりに、N末端プライマー領域の下流の44塩基領域(すなわち、416~435nt;図1)に相補的なGPO1特異的プライマー1

(5'-AATCTTTGTGGTCACTGGCG)

を置き換えて、ブドウ果実のポリ(A)⁺に富むRNAから合成した。反応混合物を0.1xTEで2mlまで希釈し且つセントリコン(Centricon)30スピニフィルター(アミコン・コープ)によって4000gで20分間遠心分離して過剰のプライマーを除去した。この工程を繰返し、そして残留する液体

を、スピードVac遠心分離を用いて20μlまで濃縮した。ポリ(dA)尾部配列は、37℃で5分間続いて65℃で5分間インキュベートした後にTEで500μlまで希釈されたcDNA11.5μl、5xテリングバッファー(プロメガ・コープ)4μl、ATP(1mM)4μlおよびターミナルdトランスフェラーゼ(プロメガ・コープ)10Uを含む反応混合物20μl中のターミナルdトランスフェラーゼによってcDNA鎖の3'末端に結合された。ポリ(dA)末端付きcDNAのPCR増幅は、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)1.25U、200nMハイブリッドdT17-アダプタープライマーおよび、N末端プライマー結合性領域のすぐ下流の領域(374~393nt;図1)に相補的な900nM GPO1特異的プライマー2

(5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG)

を含む反応混合物中において実施した。増幅は、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。得られた430bpフラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターでクローン化し、前記のように配列決定し、そしてGPO1クローンと重複する配列の予想領域を含むことが分かり、このcDNAクローンはGPO1mRNAの5'末端を含むことが確認された。

実施例5

豆の葉のPPO遺伝子のクローニング

リザイアンおよびクラーク(1)の方法にしたがって、全RNAをソラマメの葉から単離した。全RNAを1種類のオリゴdTスパンカラム(ファーマシア・LKB・バイオテクノロジー)に通すことによってポリ(A)⁺に富むRNA画分を得た。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤1U、ソラマメのポリ(A)⁺に富むRNA3.1μg、AMV逆転写酵素(プロメガ・コープ)21UおよびハイブリッドdT17

実施例6

リンゴPPO遺伝子のクローニング

リザイアンおよびクラーク(1)の方法にしたがって、全RNAを成熟リンゴ果実から単離した。ポリ(A)⁺に富むRNA画分は、ポリATトラクトmRNAキット(プロメガ・コーポレーション)を用いて得られた。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤40U、リンゴのポリ(A)⁺に富むRNA1μg、AMV逆転写酵素(プロメガ・コープ)24UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT)

0.54μgを含む反応混合物25μl中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE(10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA)で525μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

28マーオリゴヌクレオチドプライマー(GEN4)

(5'-GCGAATTCGA[AG]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA)

を、ブドウPPOの配列に基づいて設計した。

cDNAを、本質的にはフローマン(2)の方法にしたがって、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM GEN4プライマー(上記に記載の)を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローラップおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイ

17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT)

0.81μgを含む反応混合物中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE(10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA)で840μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

25マーオリゴヌクレオチドプライマー(B15)

(5'-GCGGATCCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA)

を、ブドウPPOの配列に基づいて設計した。

cDNAを、本質的にはフローマン(2)の方法にしたがって、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM B15プライマー(上記に記載の)を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローラップおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付きにし、そして2%ヌシブGTGアガロース(FMCバイオロダクツ)ゲル上で分別した。700bpフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター(ストラタジーン・クローニング・システムズ)のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを、ブドウPPOクローン(GPO1)の放射性標識フラグメントを用いてスクリーンし、そして陽性クローン(BPO1と称する)を単離し且つジデオキシ配列決定法(3)によって配列決定した。

クル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付し、そして2%メシーブGTGアガロース (FMCバイオロダクツ) ゲル上で分別した。1500bpのフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター (ストラタジーン・クロニング・システムズ) のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを、ブドウPPOクローン (GPO1) の放射性標識フラグメントを用いてスクリーンし、そして2種類の陽性クローン (pSR7およびpSR8と称する) を単離し且つジデオキシ配列決定法 (3) によって配列決定した。

実施例7

ジャガイモPPO遺伝子のクローニング

ロジマン (Logemann) ら (4) の方法にしたがって、全RNAを未熟ジャガイモ塊茎から単離した。ポリ (A)⁺に富むRNA画分は、ポリATトラクトmRNAキット (プロメガ・コーポレーション) を用いて得られた。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤40U、ジャガイモのポリ (A)⁺に富むRNA 1.8μg、AMV逆転写酵素 (プロメガ・コープ) 24UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGAATTTTTTTTTTTTTT)

0.54μgを含む反応混合物25μl中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE (10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA) で525μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを、ブドウおよびリンゴのPPOの配列中の領域から設計した。

GEN3: (5'-GCGAATTCCT[TC][TC]TTCCTT[TC]CA[TC][AC]G)

GEN7: (5'-GCGAATTC[CA][TC]GTGTA[TC][AC]GIATGTGG)

cDNAを、本質的にはフローマン (2) の方法にしたがって、10mMトリス

イマーを除去した。この工程を繰返し、そして残留する液体を、スピードVac遠心分離を用いて12μlまで濃縮した。ポリ (dA) 尾部配列は、37℃で5分間に続いて65℃で5分間インキュベートした後にTEで500μlまで希釈されたcDNA11.5μl、5xテリングバッファー (プロメガ・コープ) 4μl、ATP (1mM) 4μlおよびターミナルdトランスフェラーゼ (プロメガ・コープ) 10Uを含む反応混合物20μl中においてターミナルdトランスフェラーゼによってcDNA鎖の3'末端に結合された。ポリ (dA) 末端付きcDNAのPCR増幅は、10mMトリス-HCl (25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン (w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ (プロメガ・コープ) 1.25U、200nMハイブリッドdT17-アダプタープライマーおよびpSRP32およびpSRP33の5'末端の下流の233~254塩基領域に相補的な900nM ジャガイモ塊茎PPO特異的プライマー2

(5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG)

を含む反応混合物中において実施した。増幅は、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。得られたフラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターでクローン化し、前記のように配列決定し、そしてpSRP32クローンと重複する配列の予想領域を含むことが分かり、このcDNAクローンがジャガイモ塊茎mRNAの5'末端を含むことが確認された。

参考文献

1. リザイアン (Rezaian), M. A. およびクラーク (Krake), L. R. (1987)。グレーブバインの核酸抽出およびその検出 (Nucleic acid extraction and vine detection in grapevine)。J. Vir. Methods 17:277~285。
2. フローマン (Frohmann), M. A. (1990)。PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. イニス (Innis)、ゲルファンド

-HCl (25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン (w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ (プロメガ・コープ) 2.5U、100nMアダプタープライマー (5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM GENプライマー (上記に記載の) を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローランプおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付し、そして2%メシーブGTGアガロース (FMCバイオロダクツ) ゲル上で分別した。1500bpおよび1000bpのフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター (ストラタジーン・クロニング・システムズ) のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを選択し、そして3種類のクローン (pSRP32、pSRP33およびpSRP72と称する) を単離し且つジデオキシ配列決定法 (3) によって配列決定した。

ジャガイモ塊茎PPO mRNAの5'末端を有するcDNAクローンを、本質的には (2) に記載の通りであるが改め込まれたアンチセンスプライマーを用いてジャガイモ塊茎RNAから増幅させた。第一鎖cDNAを、上記に記載の通りであるがハイブリッドdT17-アダプタープライマーの代わりに、pSRP32およびpSRP33の5'末端の下流の257~278塩基領域に相補的なジャガイモ塊茎PPO特異的プライマー1

(5'-GACGGTACATTAGTGTAAAT)

を置き換えて、ジャガイモ塊茎のポリ (A)⁺に富むRNAから合成した。反応混合物を0.1xTEで2mlまで希釈し且つセントリコン30スピニフィルター (アミコン・コープ) によって4000gで20分間遠心分離して過剰のブラ

(Gelfand), D. H.、スニンスキー (Sninsky), J. J.、ホワイト (White), T. J. 監修、アカデミック・プレス (Academic Press)、ニューヨーク、28~38頁。

3. サンガー (Sanger), F.、ニックレン (Nicklen), S. およびクルソン (Coulson), A. R. (1977)。鎖終結阻害剤によるDNA配列決定 (DNA sequencing with chain-terminating inhibitors)。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463~5467。

4. ロジマン (Logemann), J.、シェル (Schell), J. およびウィルミッツァー (Willmitzer), L. (1987)。植物組織からRNAを単離する改良法 (Improved method for the isolation of RNA from plant tissues)。Analytical Biochemistry 163:16~20。

最後に、本明細書中に概説した本発明の精神から逸脱することなく様々な他の修正および/または変更を行なうことができることは理解されるべきである。

FIGURE 1

10 20 30 40 50 60
ATCACTCATCACTCCTCCTCTAAAGCTATGGCTTCTTTCCTTGGTGGCTCACAACCTCC
M A S L P W S L T T S

70 80 90 100 110 120
ACCGCCATCGCCAAACACCAACATTTCAGGCTTCCACCTTCTCCCTTGTTCAAAGG
T A I A N T T N I S A F P P S P L F Q R

130 140 150 160 170 180
GCTTCTCATGTCCCGTAGCCAGAAACCGAAGCCGAGATTGCTCCTAGTAAGGTGTGG
A S H V P V A R N R S R R F A P S K V S

190 200 210 220 230 240
TGCAATTCTGCGAATGGTATGCCAACTCGGATTCTACCTCCGACGTTCCGAGAACTTCC
C N S A N G D P N S D S T S D V R E T S

250 260 270 280 290 300
TCAGGGAAGTTAGATAGGAGGAATGTGCTTCTGGCATAGGAGGGCTGTATGGTGTGCT
S G K L D R R N V L L G I G G L Y G A A

310 320 330 340 350 360
GGCGGTCTCGCGCCACTAAGCCATTAGGCTTGGGGCTCCCATCCAGGACCGGATATA
G G L G A T K P L A F G A P I Q A P D I

370 380 390 400 410 420
TCCAAGTGTGTACCGGCACGTCGCTGATGGTGAACGCCCAAAATTGCTGCCGCCA
S R C G T A T V P D G V T P T N C C P P

430 440 450 460 470 480
GTACCCAGAAAGATTATAGATTTCCAGCTACCTTCTCAGGTTCCCCCATCGGTACCGAGG
V T T K I I D F Q L P S S G S P M R T R

1030 1040 1050 1060 1070 1080
CCTGGAGCGGGTACCCTTGAGCACGCCCCACATAATAGTCCACAAATGGACTGGTCTT
P G A G T L E H A P H N I V H K W T G L

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GCTGATAAGCCTAGTGAGGACATGGGAACTTCTATACTGCCGCGAGAGACCCATATTC
A D K P S E D M G N F Y T A G R D P I F

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TTCGGTCACCACGCCAATGTGATCGGATGTGGAATATATGGAATACTATAGGAGGTAA
F G H H A N V D R M W N I W K T I G G K

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AATAGAAAGGATTTACGGATACGGATTGGCTTGACGCCACGTTCTGCTTCTACGACGAG
N R K D F T D T D W L D A T F V F Y D E

1270 1280 1290 1300 1310 1320
AACAAACAACCTTGTAAAGTCAAGGTCTCGGACTGTGTCCGACCTTCCAAGCTGAGATAC
N K Q L V K V K V S D C V D T S K L R Y

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CAATATCAGGATATTCTATTCCATGGCTACCAAAAAATACGAAGGCCAAAGCGAGAGCG
Q Y Q D I P I P W L P K N T K A K A K T

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ACCAACAAAGTTCAGTCCGGAGTAGCGAAAGCGGCGAAGTCCCAAGACGACGATC
T T K S S K S G V A K A A E L P K T T I

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AGCAGCATCGGAGACTTCCCAAGCTCTTAAGTCAAGTGAAGAGTGAAGTTCCTCAAGG
S S I G D F P K A L N S V I R V E V P R

1510 1520 1530 1540 1550 1560
CCAAAGAAATCAAGAAGCAAGGAGAAAGAGGATGAGGAAGAGGTGTTACTGATAAAA
P K K S R S K K E K E D E E E V L L I K

490 500 510 520 530 540
CCAGTGTCTCACTTGGTCAGCAAGAGTACTTAGCCAACTATAAAAAGGCCATTGAGCTG
P A A H L V S K E Y L A K Y K K A I E L

550 560 570 580 590 600
GCAGAAAGTCTTCTGATGATGATCCGCTGATTTCAAGCAACAGGCTAATGTCCATTGC
Q K A L P D D D P R S F K Q Q A N V H C

610 620 630 640 650 660
ACCTATTGCCAAGGGGCTTATGATCAGGTTGGGTATACCGACCTAGAACTCCAGTTTCAT
T Y C Q G A Y D Q V G Y T D L E L Q V H

670 680 690 700 710 720
GCTTCATGGCTTTTCTCCCTTCCACCGTACTATCTCTACTTCAATGAGAGAATTCTT
A S W L F L P F H R Y Y L Y F N E R I L

730 740 750 760 770 780
GCCAAGTTGATCGAGGATCCACCTTCGCTTTCCTTATGGGCTTGGGATAACCTGTAT
A K L I D D P T F A L P Y W A W D N P D

790 800 810 820 830 840
GGCATGTATATGCCGACCATCTATGCTAGTTCCTCCATCATCACTCTACGACGAGAAGCGC
G M Y M P T I Y A S S P S S L Y D E K R

850 860 870 880 890 900
AACGCCAAGCACCTGCTCCGACTGTGATCGATCTCGACTACGATGGCACCAGAACCCACA
N A K H L P P T V I D L D Y D G T E P T

910 920 930 940 950 960
ATCCCTGATGACGAATCAAAAACGACAATCTGGCAATCATGTACAAACAAATTGTGTGG
I P D D E L K T D N L A I M Y K Q I V S

970 980 990 1000 1010 1020
GGTGCCACGACTCCTAAGCTTTTCTTGGTTACCCATACCGCGCGCGGATGCGATTGAC
G A T T P K L F L G Y P Y R A G D A I D

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GGAATAGAGCTAGATAGAGAGAATTTCTGCAAGTTTGTATGTATACATCAACGACGAAGAT
G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D

1630 1640 1650 1660 1670 1680
TATTCAGTGAGTAGGCCTAAGAATAGTGAGTTTTCAGGAGCTTTGTGAACGTACACAC
Y S V S R P K N S E F A G S F V N V P H

1690 1700 1710 1720 1730 1740
AAGCATATGAAGAAATGAAGACGAAGACCAATCTGAGGTTTCGCGATAAATGAGCTGTTA
K H M K E M K T K T N L R F A I N E L L

1750 1760 1770 1780 1790 1800
GAGCACTTGGGAGCCGAAGATGATGAGAGTGTGATCGTACTATAGTCCCTCGTGTGGG
E D L G A E D D E S V I V T I V P R A G

1810 1820 1830 1840 1850 1860
GGCGATGATGTCACCATTTGGTGAATTGAGATCGAGTTTGTTCGATTGATCCCATCTT
G D D V T I G G I E I E F V S D

1870 1880 1890 1900 1910 1920
TCAATGATTATCCATTATATGTATGTATCAGGTAAGTCACATCTTTATGTGATTAATGGA

1930 1940 1950 1960 1970 1980
AAATGTGAGACTTCTGTACTTTCCCGTCAAGTCTTTTATTAATTAGAGCGTTGGTTA

1990
AAAAAAAA

FIGURE 2

10 20 30 40 50 60
 TTTTACGATGAGAACAA GAATCTTGTAGGGTTAATGTGAAGGACAGTCTTGACACAGAA
 F Y D E N K N L V R V N V K D S L D T E

70 80 90 100 110 120
 AAAGTAGGTTATGCTTATCAAAATGTTCCGATTCCATGGGAAATGCTAAACCTGTGCCA
 K L G Y A Y Q N V P I P W E N A K P V P

130 140 150 160 170 180
 CGAAGAACAAAGTACCAAAATGGTGGAAAGTTGAGGTTAATGATGGAACCTTAAGAAAA
 R R T K V P K L V E V E V N D G N L R K

190 200 210 220 230 240
 TCACCGACTATCTTAAAGTTTCGCAACAGAGTCCAGAAAAATACGTTACGTTTCCATTG
 S P T I L K V R Q Q S P R K Y V T F P L

250 260 270 280 290 300
 GTTTTGAATAATACAGTGAGTGCTATTGTGAAGAGGCCAAAGAAATCAAGGAGCAAGAAA
 V L N N T V S A I V K R P K K S R S K K

310 320 330 340 350 360
 GAGAAGGAAGAAGAGGAAGAGGTTTTAGTGATTGAGGGGATTGAGTTTCATATGAATATA
 E K E E E E E V L V I E G I E F D M N I

370 380 390 400 410 420
 GCCATTAAAGTTTGATGTTTATATTAATGATGAAGATGCTAAGGTTGGGCCAGGGAATCT
 A I K F D V Y I N D E D A K V G P G N T

430 440 450 460 470 480
 GAGTTTGTCTGGAAGCTTTGTGAATGTCCCTCATTCTCACAATGGACACAGTAACAAGATT
 E F A G S F V N V P H S S H C H S N K I

490 500 510 520 530 540
 ATTACTTGTTTAAGACTTGGTATAACTGATTGTGTGGAAGATTGGATGTGGAAGGCGAT
 I T C L R L G I T D L L E D L D V E G D

550 560 570 580 590 600
 GATAATATTGTGGTTACATTGGTTCCAAATCTGGGAATGGACAAGTCAAAATCAATAAC
 D N I V V T L V P K C G N G Q V K I N N

610 620 630 640 650 660
 GTCGAGATAGTGTGTAAGATTGAAAATTTCTACCACCTTTGTTATGCCACCGTCTGTGTTG
 V E I V F E D -

670 680 690
 AGCGACTTGAGAGGTAGATTTTATGTTTTT

DSR7

FIGURE 3

10 20 30 40 50 60
 GAGGACATGGGGAACCTTTTACTCCGCGCGTCCGGATCCCTGTGTTTACGCCACCATTCG
 E D M G N F Y S A G R D P L F Y A H H C

70 80 90 100 110 120
 AACGTGGACCGCATGTGGAACGTTTGGAAAAACCTCGGAGGCAAGCGCAAGGACCCACCC
 N V D R M W N V W K T L G G K R K D P T

130 140 150 160 170 180
 GACACCGATTGGCTTGACGCTGAGTTTCTGTTCTACGATGAAAACGCGGAGCTTGTGAGC
 D T D W L D A E F L F Y D E N A E L V S

190 200
 TGTAAGTTTCGGGACAGCCTCAAC
 C K V R D S L N

DSR8

10 20 30 40 50 60
 GAGGATATGGGGAATTTTCTCTCGGGGAGGGATCCGCTGTTTACTCTCACCATTCC
 E D M G N F Y S A G R D P L F Y S H H S

70 80 90 100 110 120
 AACGTGGACCGCATGTGCTTATATATAAGATAAGTTGGAGGTACGGACATAGAAAAA
 N V D R M W S I Y K D K L G G T D I E K

130 140 150 160 170
 TACCGACTGCTGGACGACAGTTCTTATTCTAGCAGGAGAACAAGAATCTTCGTGC
 Y R L L D A E F L F Y D E N K N L R

DSR12

FIGURE 4

10 20 30 40 50 60
 TTTTGGCGTTTCATCGATGGTACTTGTACTTCCAGAGAGAATCGTGGGAAAAATTCATT
 F L P F H R W Y L Y F H E R I V G K F I

70 80 90 100 110 120
 GATGATCCAACCTTCGCTTTACCATATTGGAATGGGACCATCCAAAAGGTATGCGTTTT
 D D P T F A L P Y W N W D H P K G M R F

130 140 150 160 170 180
 CCTGCCATGTATGATCGTGAAGGGACTTCCCTTTTCGATGTAACACGTGACCAAGTCAC
 P A M Y D R E G T S L F D V T R D Q S H

190 200 210 220 230 240
 CGAAATGGAGCAGTAATCGATCTTGGTTTTTTCGGCAATGAAGTTGAAACAACTCAACTC
 R N G A V I D L G F F G N E V E T T Q L

250 260 270 280 290 300
 CAGTTGATGAGCAATAATTTAACACTAATGTACCGTCAATGGTAACTAATGCTCATGT
 Q L M S N N L T L M Y R Q M V T N A P C

310 320 330 340 350 360
 CCTCGGATGTTCTTTGGCGGCGCTTATGATCTCGGGGTTAACACTGAAGTCCCGGGAAT
 P R M F F G G P Y D L G V N T E L P G T

370 380 390 400 410 420
 ATAGAAAAATCCCTCACCGTCTCTCCACATCTGGTCTGGTACAGTGAGAGTTTCAACT
 I E N I P H G P V H I W S G T V R G S T

430 440 450 460 470 480
 TTGCCCAATGGTGAATATCAACGGTGAGAATATGGGTCAATTTTACTCAGCTGGTTTG
 L P N G A I S N G E N M G H F Y S A G L

490 500 510 520 530 540
 GACCCGTTTCTTTTGGCATCACAGCAATGTGGATCGGATGTGGAGCGAATGGAAGCG
 D P V F F C H H S N V D R M W S E W K A

550 560 570 580 590 600
 ACAGGAGGGAAAAAGACGGATATCACACATAAAGATTGGTTGAAGTCCGAGTTCTTTTTC
 T G G K R T D I T H K D W L N S E F F F

610 620 630 640 650 660
 TATGATGAAATGAAACCCCTTACCGTGTGAAGTCAAGACTGTTTGGACACGAAGAAG
 Y D E N E N P Y R V K V R D C L D T K K

670 680 690 700 710 720
 ATGGGATACGATTACAAACCAATTGCCACACCATGGCTAACTTCAAGCCCTTAAACAAAG
 M G Y D Y K P I A T P W R N F K P L T K

730 740 750 760 770 780
 CCTCAGCTGGAAAAGTGAATACAGCTTCACTCCGCGAGCTAGCAATGTATTCCCACTG
 P S A G K V N T A S L P P A S N V F P L

790 800 810 820 830 840
 GCTAACTCGACAAAGCAATTTGCTTTCCATCAATAGCCGAGCTTCTGTCAGGACTCAA
 A K L D K A I S F S I N R P T S S R T Q

850 860 870 880 890 900
 CAAGAGAAAATGCACAAGAGGAGATGTTGACATTCAGTACGATAAGATATGATAACAGA
 Q E K N A Q E E M L T F S S I R Y D N R

910 920 930 940 950 960
 GCGTACATAAGGTTCCGATGCTTTTCGAAGCTGGACAATATGTGAATGCGAATGAGCTT
 G Y I R F D V F S N V D N N V N A N E L

970 980 990 1000 1010 1020
 GACAAGGCGGAGTTGCGGGGAGTTATACAGTTTCCACATGTTTCATAGAGCTGGTGAG
 D K A E F A G S Y T S L P H V H R A G E

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ACTAATCATATCGCGACTGTTGATTTCAGCTGGCGATAACGGAAGCTGTTGGAGGATATT
 T N H I A T V D F Q L A I T E L L E D I

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGTTCGAAGATGAAGATATCTATTCGCTGACTCTGCTCCAAAGAGAGCTGGTGAAGGT
 G L E D E D T I A V T L V P K R G C E G

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ATCTCCATTGAAGGTGCGAGCATCAGTCTTGCAGATTGTTAATTAGTCTCTATTGAATCT
 I S I E G A T I S L A D C - L V S I E S

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTGTGTTTCTGTTCTGTTTTCCT
 A E I T L - W M M L C F C F L V L F F P

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CTGTTGAATTCAGCTTTGTTGCTTGATTTCATTGAAGTTGTTATTCAAGATAAATCAGT
 L L K S A L L L D F I E V V I Q E - I S

TACAA
 Y

670 680 690 700 710 720
 ATGGGGTACGATTACGCACCAATGCCAATCCATGGCGTAACCTTCAAACCAAAAAACAAAG
 M G Y D Y A P M P T P W R N F K P K T K

730 740 750 760 770 780
 GCATCAGTAGGAAAAGTGAATACAACTACACTCCCGCCAGTGAACAAGGTATTCCCACTC
 A S V G K V N T T T L P P V N K V F P L

790 800 810 820 830 840
 ACGAAGATGGATAAAGCCATTTTCATTTCCATCAATAGGCGCTGCTTCATCGCGGACTCAA
 T K M D K A I S F S I N R P A S S R T Q

850 860 870 880 890 900
 CAAGAGAAAATGAACAAGAGGAGATGTTAACTGCGATAACATAAATATGATAATAGA
 Q E K N E Q E E M L T F D N I K Y D N R

910 920 930 940 950 960
 GGGTATATAAGGTTCCGATGTTTCTGAACTGGATAACAAATGTGAATGCGAATGAGCTT
 G Y I R F D V F L N V D N N V N A N E L

970 980 990 1000 1010 1020
 GATAAGGCAGAGTTCCGCGGGAGTTATCTAGTTTCCACATGTTTCACAGAGTTGGCGAG
 D K A E F A G S Y T S L P H V H R V G E

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 AATGATCATACCGGACTGTTACTTTCCAGCTGGCGATAACAGAACTGTTGGAGGACATT
 N D H T A T V T F Q L A I T E L L E D I

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGTTCGAAGATGAAGAGACTATTCCGCTGACTCTGTTACCAAGAAAGGTTGGTGAAGGT
 G L E D E E T I A V T L V P K K G G E G

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ATCTCCATTGAAAATGTGGAGATCAAGCTTCTGGATTGTTAAGTACGTTCTCAATTGAAT
 I S I E N V E I K L L D C - V R S Q L N

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CTGCTGAGATTACAACTTTGATATGTTTACTTTGTTTTCATGTAACCTTTTCCTG
 L L R L Q L - Y V F Y F C F S M - L F L

1270 1280 1290 1300 1310
 TTGAAATCAGCTTGATGCTTGTATTCCTTGGAGTTGTTATTCACTAATAAATCA
 L K S A - C L I S L E L L F T N K I

DSRP11

10 20 30 40 50 60
 TCTTGGCGCTTCCACCGATGGTACTTATCTTACGAGAGAATATTGGAAAACTCATC
 F L P F H R W Y L Y F Y E R I L G K L I

70 80 90 100 110 120
 GATGATCCAACTTTCGCTTTACCATATTGGAATTTGGGATCATCAAGGGGATCGCTTTA
 D D P T F A L P Y W N W D H P K G M R L

130 140 150 160 170 180
 CCTCCCATGTTGATCGTGAAGGAACCTTATTACGACGAAAGGGTAAATCAACAAGTC
 P P M F D R E G T S I Y D E R R N Q Q V

190 200 210 220 230 240
 CGTAAACGGAACCGTTATGGATCTTGGTTCATTTCGGGACAAAGTCCAAACAACTCAACTC
 R N G T V M D L G S F G D K V Q T T T Q L

250 260 270 280 290 300
 CAGTTGATGAGCAATAATTAACTAATAATGACCTCAATGCTAACTAATGCTCCATGT
 Q L M S N N L T L M Y R Q M V T N A P C

310 320 330 340 350 360
 CCTCTTTTCTTCTCGGTCGCGCTTACGTTCTTGGGAATAACGTCGAAGCCCGGGAACC
 P L L F F G A P Y V L G N N V E A P G T

370 380 390 400 410 420
 ATTGAAAACATCCCTCATATACCTGCTCATATTTCGGCTGCTACAGTACGTTGCTCAACA
 I E N I P H I P V H I W A G T V R G S T

430 440 450 460 470 480
 TTTCTAATGGTGATACGTCATACGCTGAGGATATGGGTAATTTCTACTCAGCTCGTTTA
 F P N G D T S Y G E D M G N F Y S A G L

490 500 510 520 530 540
 GACCCCGTTTCTATTGGCCACCGCAATGTGGACCGTATGTGGAATGAATGGAAGGCA
 D P V F Y C H H G N V D R M W N E W K A

550 560 570 580 590 600
 ATAGGAGCTAAGACAAGGATTTATCAGAAAAGATTGCTGAACTCTGACTTCTCTCTT
 I G G K R R D L S E K D W L N S E F F F

610 620 630 640 650 660
 TATGATGAAAACAAAAGCCTTACCGTGTCAAAGTCCGAGACTGTTTGGACGCGAAGAAA
 Y D E N K K P Y R V K V R D C L D A K K

DIDSPACE4

10 20 30 40 50 60
 TTTTTTTTATTCAAAGCTAGCAATAATGGCAAGCTTGTGCAATAGTTGTACTACATCC
 M A S L C N S C S T S

70 80 90 100 110 120
 CTCAAACTCTCTTTACTTCTTCTCCACTTCTTTAACTTCCACTCTAAACCTCTCAA
 L K T P F T S S S T S L T S T P K P S Q

130 140 150 160 170 180
 CTTTTCATGATGAAAACGTAACCAATGTTCAAAGTTTCATGCATGGTTACCAATAAT
 L F I H G K R N Q M F K V S C M V T N N

190 200 210 220 230 240
 AACGGTGACCAAAACCAAAACGTTGAAACGAATTCGTTGATCGAAGAAATGTTCTTCT
 N G D Q N Q N V E T N S V D R R N V L L

250 260 270 280 290 300
 GGCTTAGGTGCTCTTTATGTTGTTGTAATGCTATACCATTAGCTGCATCGCTACTCCA
 G L G G L Y G V A N A I P L A A S A T P

310 320 330 340 350 360
 TCTCACTCTCTGATCTCTGCTTGTAGTATAGCCAGGATTAACGAAACTCATGTGGTG
 S P P P D L S S C S I A R I N E T H V V

370 380 390 400 410 420
 CCGTACAGTTGTTCCGCGCTAAGCCTGATGATGGAGAAAGTTCGCTATTACAAGTTC
 P Y S C C A P K P D D M E K V P Y Y K F

430 440 450 460 470 480
 CTTCTATGACTAAGCTCCGTTGCTGAGCCTGCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATT
 P S M T K L R V R Q P A H E A N E E Y I

490 500 510 520 530 540
 CCCAAGTACAATTTGGCGTTAGCAAGATGAGGATCTTGATAAGACACAACCTTTAAAC
 A K Y N L A V S K M R D L D K T Q P L N

550 560 570 580 590 600
 CCTATTGTTTAAAGCAACAGCTAATATACATTGTGCTTATTGTAACGGTGTATTATAGA
 P I G F K Q Q A N I H C A Y C N G A Y R

610 620 630 640 650 660
 ATTGGTGGCAAGAGTTACAAGTTCATAATTCTTGGCTTTCTTCCGCTTCCATAGATGG
 I G G K E L Q V H N S W L F F P F H R W

平成 6年 1月17日



特許庁長官 麻 生 渡 殿

1. 特許出願の表示

PCT/AU92/00356

2. 発明の名称

ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

3. 特許出願人

住 所 オーストラリア連邦オーストラリアン・キャピタル・
テリトリ 2601, キャンベル, ライムストーン・
アベニュー (番地なし)
名 称 コモンウェルス・サイエンティフィック・アンド・
インダストリアル・リサーチ・オーガナイゼーション

4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電 話 3270-6641~6646
氏 名 (2770) 弁理士 湯 浅 恭 三

5. 補正書の提出日

平成 5年 5月 4日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通



34条補正

(差し替え用紙第2、3、3a頁の翻訳文: 原翻訳文第1頁26行~第3頁25行と差し替える)

これらの場合、PPOの量を増大させて、望ましい程度の褐変または風味成分の変化を生じさせることが望ましいことがある。

正常な植物の成長および発育におけるPPOの役割は、現在のところ理解されていない。この酵素の増大した濃度が植物病原体に対する増大した耐性と相関している場合が多数存在している。当然の結果として、PPO活性の水準を増大させる植物の遺伝子操作は、病原体および有害生物に対する有用な耐性を与えることができる。

グレープバイン (grapevine) のPPO遺伝子は、成熟タンパク質のN末端の上流の追加の103アミノ酸をコードする。この領域は、葉緑体トランシットペプチドの性質を有し、しかもタンパク質が葉緑体中に引き入れられ且つ成熟PPOタンパク質を生産するように処理されるように目的を絞るためのものであると考えられる。この遺伝子による植物の形質転換は、したがって、他種においてグレープバインPPOの正しい標的および成熟を生じ且つこれらの組織の色素体中で活性グレープバインPPO酵素の蓄積を引起することができ。

本明細書中で用いられる「PPOをコードしている遺伝子」、「PPOをコードする遺伝子」または「PPO遺伝子」は、PPO遺伝子またはそれと実質的に相同の配列を意味すると理解されるべきである。

本発明の第一の態様において、植物ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

DND配列は、トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のブレ配列を含んでいてよい。

DND配列は修飾されていてもよい。DNA配列は、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含んでいてよい。

い。

DNA配列は、触媒開裂部位を更に含んでいてよい。

或いは、ブレ配列は、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けるように他の標的配列によって置き換えることができる。

DNA配列は、図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質を含んでいてよい。

DNA配列は、図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図3に図示したような、リンゴ果実PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図4に図示したような、ジャガイモ塊茎PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント; および

プラスミド発現ベクターを提供し; そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法を提供する。

PPOをコードするDNA配列は、例えば、植物試料から単離されたポリアダニル化RNAから生成することができる。植物は、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択することができる。好ましくは、植物試料は、スルタナブドウ果実、ソラマメの葉、リンゴの外皮若しくは皮層またはジャガイモ塊茎から単離される。

PPOをコードするDNA配列を提供するために、本発明の好ましい態様において、組換えDNAプラスミドの製造方法は、

植物PPO活性を有するポリペプチドを提供し；

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し；そして

コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含むことができる。

ポリアデニル化RNAの単離は、オリゴ-dTスパンカラムを用いて実施することができる。

(差し替え用紙第5、6、6a頁の翻訳文；原翻訳文第4頁22行～第7頁1行と差し替える)

或いは、本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアデニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデノシン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し；そして

そのように生成されたポリアデニル化cDNAをPCRによって増幅させることを含むことができる。

ポリアデニル化RNAを逆転写酵素で処理する工程は、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTTGGTGACTGGCG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができるまたは該PPO特異的プライマーはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'GACGGTACATTAGTCTTAAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTCTTTTCTTTTCTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

二本鎖cDNAのクローニングのためのプラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。プラスミドベクターブルースクリプト

(Bluescript) SK⁺は適当であることが分かっている。

クローニング工程は任意の適当な形式をとってよい。好ましい形式は

cDNAを、例えば、クレンジングフラグメントでプラント末端付きにし；

そのように生成されたcDNAを、例えば、アガロースゲル上で分別し；

予想の寸法のフラグメントを、例えば、ゲルから単離し；そして

該フラグメントを適当な制限酵素部位、例えば、ブルースクリプトSK⁺ベクターのHindIIIまたはEcoRI部位に連結することを含むことができる。

このように生成されたクローンを試験するために、適当な微生物をプラスミド発現ベクターによって形質転換することができ、該微生物を培養し、そしてそこにおいてコードされたポリペプチドを発現させることができる。微生物大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5は適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミドを提供する。

プラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。組換え体プラスミドは、PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする修飾遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードしている配列またはそのフラグメントを含むことができる。DNA構築物は、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいることができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレ

ーブパイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆を含む群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、植物PPO遺伝子のブレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むことができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから成る群より選択することができる。

(差し替え用紙第8、9、10、10a頁の翻訳文：原翻訳文第7頁28行～第10頁20行と差し替える)

本発明のもう一つの態様において、形質転換した植物であって、正常なPPO遺伝子の発現を変更しうる合成遺伝子を含む上記植物を提供する。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴ、タバコ、豆、モモ、ナシおよびアズキから成る群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしている配列またはそのフラグメントを含む植物用ワクチンを提供する。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供する。

プローブは、任意の適当な方式で標識することができる。放射性標識または非放射性標識を用いることができる。便宜上、プローブは、適当なプラスミドベクター中のクローン化されたインサートの形で提供することができる。

グレープバインPPO配列を用いて、この遺伝子を他の種から得るようにPCRで用いるための一般的な目的オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。植物PPOタンパク質は補欠分子族として銅を含むことが知られており、そしてヘモシアニンおよびチロシナーゼタンパク質からの配列に対して同族を示す、これらのタンパク質上の銅結合性部位に対応するブドウタンパク質配列の二つの領域が識別された。これらの領域は種々の生物間で明らかに保存されるので、それらは、他の植物PPO遺伝子を得るようによりプローブおよびプライマーを設計するのに適している。

したがって、本発明の更にもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして

発現ライブラリー；および

PPO活性を有する精製ポリペプチドに対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして

該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

本発明のもう一つの態様において、PPOタンパク質の精製法であって、

植物試料；

デタージェント；および

1種類またはそれ以上のクロマトグラフィーカラムを提供し；

該植物試料を該デタージェントで抽出し；

そのように生成された抽出物を硫酸アンモニウムで処理し；そして

そのように生成された抽出物を、それをクロマトグラフィーカラムに通すことによって分別することを含む上記方法を提供する。

植物試料は任意の適当な種類であってよい。植物試料はグレープバイン果実であってよい。この組織は高濃度のPPOを含み、成熟ブドウ果実の果汁中の大部分のPPO活性は固形物によるものであり、遠心分離によって果汁から分離した後にデタージェントによって可溶化することができる。植物試料は豆の葉であってよい。

デタージェントは陽イオン性であってよい。臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)デタージェントは適当であることが分かっている。

クロマトグラフィーカラムはセファロース基材であってよい。3種類のクロマトグラフィーカラムを用いることができる。Q-セファロースに続いてフェニル-セファロース、次にヒドロキシルアパタイトが適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する実質的に純粋な状態の植物PPO活性を有するポリペプチドを提供する。

ここで、本発明を実施例および図面に関して更に十分に記載する。しかしながら、以下の説明が単に例示するためのものであることは理解されるべきであり、

該プローブをゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

DNAプローブは、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含むことができる。

DNAプローブは、植物種からの全cDNA；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを行なって、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造することができる。

オリゴヌクレオチドプライマーは、植物PPO活性を有するポリペプチド上の銅結合性部位に対応するDNA配列を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物種から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法を提供する。

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプライマーは、リンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子配列に基づくことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

いかなる場合にも上記の本発明の一般性を制限するものとしてとるべきではない。

図面において、

図1：

推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質双方をコードする複合完全長GPO1 cDNAヌクレオチド配列および誘導タンパク質配列。

翻訳開始部位をボールド体で示し、成熟タンパク質のN末端に星印を付ける。

(原請求の範囲を以下の新請求の範囲に全文差し替える：原翻訳文第23～28頁)

請求の範囲

1. 植物ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント。
2. トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のプレ配列を含むDNA配列。
3. トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のプレ配列を含む請求項1に記載のDNA配列。
4. 植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項1に記載のDNA配列。
5. 植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列を含むDNA配列またはそのフラグメント。
6. 触媒開裂部位を組み込んでいる請求項1に記載のDNA配列。
7. プレ配列が、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えられている請求項3に記載のDNA配列。
8. 図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシットペプチド配列および成熟グレープバインPPOポリペプチドをコードする配列を含む請求項3に記載のDNA配列。
9. 図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
10. 図3に図示したような、リンゴ果実のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
11. 図4に図示したような、ジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
12. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそ

5'-CCATCAGGCGCCGATATTCGAGTGTGG;

豆cDNAの増幅用に用いられる場合に配列

5'-GCGGATCCTT(CT)TA(CT)GA(CT)GA(AA)(CT)AA;

リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

(5'-GCGAATTCGA(AG)GA(TC)ATGGGIAA(TC)TT(TC)TA);

そしてジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

GEN3: (5'-GCGAATTCCTT(TC)(TC)TTCCTT(TC)CA(TC)(AC)G)

GEN7: (5'-GCGAATTCAA(TC)GTIGA(TC)(AC)GIATGTGG)

を有する請求項18に記載の方法。

20. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し;

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデニン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し;そして

そのように生成されたポリアデニル化cDNAを、PCRを用いて増幅させることを含む請求項15に記載の方法。

21. PPO特異的プライマーが、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTGTGGTGACTGGCG

を有するオリゴヌクレオチドプライマーでありまたは該PPO特異的プライマーが、ジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5' GACGGTACATTAGTCTTAAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである請求項20に記載の方法。

22. cDNAを増幅させる工程が、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCGCGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG

のフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント;および

プラスミド発現ベクターを提供し;そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法。

13. DNA配列を、植物試料から単離されたポリアデニル化RNAから生成する請求項12に記載の方法。

14. 植物試料を、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択する請求項13に記載の方法。

15. 植物PPO活性を有するポリペプチド源を提供し;

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し;そして

コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含む請求項13に記載の方法。

16. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し;そして

そのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅させることを含む請求項15に記載の方法。

17. アダプタープライマーが、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプターである請求項16に記載の方法。

18. cDNAを増幅させる工程が、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCG

を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いる請求項17に記載の方法。

19. 5'末端プライマーが、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる請求項21に記載の方法。

23. プラスミド発現ベクターがプラスミドベクタープラスクリプトSK⁺であり且つDNA配列がcDNA配列である請求項22に記載の方法。

24. DNA配列をプラスミド発現ベクター中に配置する工程が、

cDNAをプラント末端付きにし;

そのように生成されたプラント末端付きcDNAを分別し;

予想の寸法のフラグメントを単離し;そして

該フラグメントをプラスクリプトSK⁺ベクターの適当な制限酵素部位に連結することを含む請求項23に記載の方法。

25. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミド。

26. DNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含む請求項25に記載の組換え体プラスミド。

27. DNA配列が、ブドウ、豆、リンゴまたはジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする請求項26に記載の組換え体プラスミド。

28. 植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする修飾遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物;および

植物試料を提供し;そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。

29. DNA構築物が、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項28に記載の方法。

30. DNA構築物が、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組み込んでいる請求項28に記載の方法。

31. 植物試料を、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆から選択さ

れた植物から得る請求項28に記載の方法。

32. DNA構築物が、

DNA配列を導入された二成分ベクター；および

果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項28に記載の方法。

33. 植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。

31. DNA構築物が、トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のブレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含む請求項33に記載の方法。

35. ブレ配列が、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えられている請求項34に記載の方法。

36. 植物試料を、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから選択された植物から得る請求項33に記載の方法。

37. DNA構築物が、

DNA配列を導入された二成分ベクター；および

果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項33に記載の方法。

38. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブ。

39. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして

該プローブを該ゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法。

40. DNAプローブが、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含む請求項39に記載の方法。

41. DNAプローブを、

植物種からの全cDNA；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを実施して、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造する請求項39に記載の方法。

42. オリゴヌクレオチドプライマーが、植物PPO活性を有するポリペプチド上の銅結合性部位に対応するDNA配列を含む請求項41に記載の方法。

43. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物から単離されたmRNA；

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

該mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法。

44. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

発現ライブラリー；および

PPOを有する精製ポリペプチドに対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして

該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法。

45. N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する、実質的に純粋な状態の植物PPO活性を有するポリペプチド。

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C12N 15/53 9/02 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Museum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC C12N Documentation searched other than museum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: C12N 15/53 9/02 Electronic data base consulted during the international search (name of data base, and where practicable, search terms used) DERWENT DATABASE; WPAT-KEYWORDS: POLYPHENOL OXIDASE, PPO, CATECHOL OXIDASE, TYROSINASE, DIPHENOL OXIDASE, BIOT KEYWORDS: CATECHOL OXIDASE, POLYPHENOL OXIDASE, PPO, SEQUENCE, PLASMID, DNA, CDA, RECOMBINANT CHEMICAL ABSTRACTS; STN DATABASE AMINO ACID SEQUENCE; CASA-KEYWORDS: TYROSINASE, POLYPHENOL OXIDASE, PPO, BROWNING		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to Claim No.
X	AU.A. 81547/87 (DONALD GUTHRIE FOUNDATION FOR MEDICAL RESEARCH) 7 April 1988 (87/04.88) pages 1, 20-21, claims 1, 4 and 7	1, 35
X	Derwent BIOT Online Abstract Accession no. 90-12612 Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Poch Meeting, page 163, 1990, Williams et al. "Molecular cloning and partial characterization of the polyphenol-oxidase (PPO) gene of Corchorus verticillatus" Entire Abstract	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family source.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "L" document which may throw doubt on priority claims "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" long document published after the international filing date of priority date and that in conflict with the application but used to understand the contents of the application "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or obvious by a person skilled in the art without knowledge of the document "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account "Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, each comprising being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 1992 (22.10.92)		Date of making of the international search report 3 Nov 1992 (03.11.92)
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Faxes No. 06 2839979		Authorized officer R. OSBORNE Telephone No. (06) 2832313

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	Derwent W/PAT Online Abstract Accession no. 87-294429/42, JP-A. 62305783 (AJINOMOTO KK) 6 March 1986 (06.03.86)	

Form PCT/ISA/210 (continuation of annex I July 1992)

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
AU	81547/87	CA	1293940	EP	290504
		WO	86/02372	US	4698814
END OF ANNEX					

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992) optional

フロントページの続き

(72) 発明者 ドライ, イアン・バリー
 オーストラリア連邦サウス・オーストラリ
 ア州5039, メルローズ・パーク, キングス
 トン・アベニュー 111